Nachweis von Peptidase-Aktivitäten in Placenta- und Eihautextrakten

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Hanna Müller

Saarbrücken

1970

Druck:
Universitätsbibliothek Saarbrücken

Meinem verehrten Onkel, Herrn

Chefarzt Dr. Josef S c h m i d,

in Liebe und Dankbarkeit

gewidmet.

Die mündliche Promotionsprüfung wurde am 5.2.1970 abgelegt.

AUS DEM PHYSIOLOGISCH - CHEMISCHEN INSTITUT DER
UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
Direktor: Professor Dr.med., Dr.phil. R. AMMON

NACHWEIS VON PEPTIDASE-AKTIVITÄTEN IN PLACENTA- UND EIHAUTEXTRAKTEN.

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N
zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1 9 6 9

vorgelegt von
Hanna Müller
geb. am 29.11.1941 in Dillingen/Saar

Dekan: Professor Dr. G. DHOM
Referent: Priv.Doz. Dr. E. ZOCH

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	4
B. BISHERIGE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS VORKOMMEN VON PEPTIDASEN IN DER MENSCHLICHEN PLACENTA	7
C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	9
METHODIK	11
ERGEBNISSE	18
1. Hydrolytische Spaltung von Glycyl-Peptiden	18
a) reine Glycyl-Peptide als Substrate	19
b) gemischte Glycyl-Peptide als Substrate	24
c) Spaltung von enantiomeren Glycyl-Peptiden	33
2. Hydrolyse von Leucyl-Peptiden	37
a) enantiomere Tripeptide als Substrate	38
b) enantiomere Dipeptide als Substrate	41
c) Hydrolyse von gemischten Leucyl-Peptiden	44
3. Hydrolytische Spaltung von L-Prolyl-Glycin	44
4. Hydrolyse von Carnosin (ß-Alanyl-L-histidin)	45
5. Diskussion der Ergebnisse	5o

UNIV. LEIDEN BIBL.

Seite

D. ZUSAMMENFASSUNG 59

E. LITERATUR 62

F. ANHANG: Abbildungen der Chromatogramme 67

A. EINLEITUNG

Die Placenta ist bekanntlich das Ernährungs-, Atmungs- und Exkretionsorgan des Feten, gleichzeitig auch eine Stätte der Hormonbildung (1-8). Sie entsteht durch die Aneinanderlagerung oder Verwachsung der Uterusschleimhaut mit der kindlichen Zottenhaut, dem Chorion, das zu den Eihäuten gezählt wird (9). Wie FRANKEN (1o) sehr treffend formuliert, vollbringt die Placenta die staunenswerte Leistung, "den mütterlichen und kindlichen Stoffwechsel auf das innigste zu koppeln, gleichzeitig aber die biologische Einheit und Integrität beider Individuen gegeneinander vollständig abzugrenzen und bis zur Geburt aufrecht zu erhalten."

Zur Ernährung des Feten dienen die Nährstoffe des mütterlichen Blutes, die dann vom fetalen Blut an die wachsenden kindlichen Organe herangebracht werden. Der fetomaternelle Stoffaustausch erfolgt auf dem Weg der Diffusion durch die Gefäßwände sowie durch eine aktive Leistung der fetalen Zellen. Die Diffusion wird beeinflußt durch die Differenz des beiderseits der Placentamembran herrschenden hydrostatischen Druckes und durch das Konzentrationsgefälle der zu transferierenden Sub-

stanzen. Jene Konzentrationsunterschiede lassen sich mit den Veränderungen erklären, welche die Substanzen durch und für den transplacentaren Austausch erfahren. Mit Hilfe der Isotopentechnik konnte der aktive Vorgang sehr gut verfolgt werden (11).

Nach STRAUSS (12) wird die Hauptmenge der für die fetale Ernährung auszunutzenden Proteine in Form freier Aminosäuren übertragen, wobei in der Placenta eingreifende Umbauvorgänge stattfinden, denn der Eiweißgehalt des mütterlichen und kindlichen Blutes stimmt in keiner Graviditätsphase überein. Obwohl der Eiweißgehalt im fetalen Blut mit fortschreitender Gravidität ansteigt, erreicht dieser nie materne Werte. Auch BERGSMA (13) nimmt an, daß einige Aminosäuren im fetalen Teil der Placenta nicht direkt von der Mutter als freie Aminosäuren übertragen worden sind, sondern Produkte einer hydrolytischen Aktivität des placentaren Organs gegenüber mütterlichen Polypeptiden und Proteinen als Substrate darstellen.

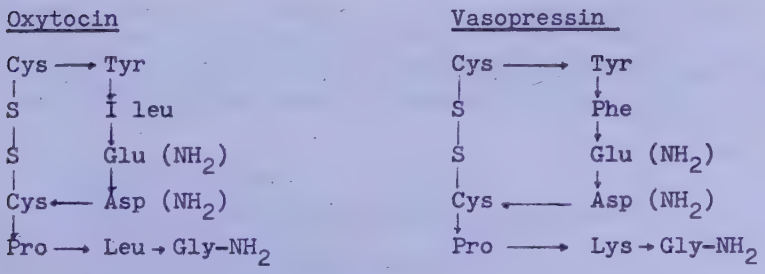
Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher - neben einem Überblick über das vorliegende Schrifttum - vor allem den enzymatischen Peptidabbau in der Placenta näher zu untersuchen. Denn ein Organ mit einer so großen Wachstums-

potenz und mit einem notwendigerweise intensiven Intermediärstoffwechsel weist zweifellos einen erheblichen Aminosäuren- und Eiweißumsatz auf. Daher kommt auch den eiweiß- bzw. peptidspaltenden Enzymen, welche für den Eiweiß- bzw. Peptidabbau maßgebend sind, eine erhebliche Bedeutung zu.

Es wird versucht, den Nachweis und die Charakterisierung der peptidatischen Aktivitäten gegenüber Glycyl- und Leucylpeptiden - unter besonderer Berücksichtigung der optischen Isomeren - sowie gegenüber dem Dipeptid Carnosin in der Placenta und in den Eihäuten mit Hilfe chromatographischer und papierelektrophoretischer Methoden zu führen.

B. BISHERIGE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS VORKOMMEN VON PEPTIDASEN IN DER MENSCHLICHEN PLACENTA.

Mit Ausnahme des Oxytocin- und Vasopressin-abbauenden Enzyms liegen wenige - und zum Teil unzureichende - Untersuchungen über Peptidasen in der menschlichen Placenta vor. Die Placenta kann durch spezifische Peptidasen diese beiden, im Hypophysenhinterlappen gebildeten Peptidhormone Oxytocin und Vasopressin hydrolysieren, wodurch die Hormone inaktiviert werden. Beide Polypeptide sind aus acht Aminosäurenresten mit einer Disulfidbrücke aufgebaut, die sich nur durch die Aminosäure in Stellung 3 und 8 unterscheiden (siehe Formelschema). Die enzymatische Inaktivierung von Oxytocin, die man einer spezifischen Oxytocinase zuschreibt, wird wahrscheinlich durch die Spaltung der Cystein-Tyrosin-Bindung im Ring hervorgerufen (14). Eine einwandfreie Trennung und Abgrenzung gegenüber der Vasopressinase ist bisher noch nicht gelungen.



FIDENZA und Mitarbeiter (15,16) fanden D-Peptidasen in Glycerinauszügen frischer menschlicher Placenten. ABDERHALDEN (17) hat keine Aktivität gegenüber Glycyl-D-leucin nachweisen können. IWIG und HASCHEN (18) hingegen fanden nur eine sehr geringe Glycyl-D-Leucin-spaltende Aktivität.

VESCIA und Mitarbeiter (19) konnten im Placentaextrakt neben einer Leucinaminopeptidase, die durch Mn^{2+}, nicht aber durch Co^{2+} aktivierbar ist, eine Dipeptidase nachweisen, die bei p_H 7,8 Glycyl-glycin spaltet und durch Mn^{2+} und Co^{2+} aktiviert wird, sowie eine Glycyl-L-leucin-Dipeptidase, die durch Mn^{2+} aktiviert, jedoch durch Zn^{2+} inhibiert wird.

BEKAL (2o) beobachtete in anderen menschlichen Geweben eine ähnliche Abhängigkeit der Peptidasen von Metallionen.

Untersuchungen von ZOCH (21) über peptidatische Aktivitäten von Placentaextrakten mittels papierelektrophoretischer und papierchromatographischer Methoden ergaben das Vorliegen von Aminotripeptidase - (22, 23, 24), von Leucinaminopeptidase - (22), von Glycyl-glycin-Dipeptidase - (22, 25) und von Glycyl-L-leucin-Dipeptidase-Aktivität (25, 26) sowie das Vorkommen einer Prolidase-Aktivität (22, 27).

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Aufbauend auf den letztgenannten Versuchen und unter teilweiser Benutzung der gleichen Methoden (28) mit zusätzlichen dünnschichtchromatographischen Analysen (29, 3o) werden die peptidatischen Aktivitäten von Placenta- und Eihautextrakten gegenüber einer Anzahl von Di- und Tripeptiden sowie einem Tetrapeptid untersucht. Besondere Beachtung schenken wir dem enzymatischen Verhalten gegenüber den D- und L-Isomeren von Glycyl- und Leucylpeptiden sowie der Aktivität gegenüber Carnosin. Denn seit ABDERHALDEN (17) und FIDENZA (15) sind keine Untersuchungen mehr über die stereochemische Spezifität der Placenta-Peptidasen vorgenommen worden (21).

Es wird versucht, die verschiedenen peptidatischen Aktivitäten in der papierelektrophoretisch aufgetrennten Eiweiß-Fraktionen des Placentaextraktes zu lokalisieren.

Als Substrate werden die folgenden, im Handel als "chromatographisch rein" bezeichneten Peptide verwendet:

1) Glycyl-Peptide:

Glycyl-glycyl-glycyl-glycin (Tetraglycin)

Glycyl-glycyl-glycin (Triglycin)

Glycyl-glycin (Diglycin)

Glycyl-glycyl-L-prolin (Gly-gly-L-pro)

Glycyl-L-prolin (Gly-L-pro)

Glycyl-L-tyrosin (Gly-L-tyr)

Glycyl-L-phenylalanin (Gly-L-phe)

Glycyl-L-histidin (Gly-L-his)

Glycyl-L-methionin (Gly-L-meth)

Glycyl-L-alanin (Gly-L-al)

Glycyl-ß-alanin (Gly-ß-al)

Glycyl-dehydro-alanin (Gly-dh-al)

Glycyl-glycyl-L-leucin (Gly-gly-L-leu)

Glycyl-glycyl-D-leucin (Gly-gly-D-leu)

Glycyl-L-leucin (Gly-L-leu)

Glycyl-D-leucin (Gly-D-leu)

2) Leucyl-Peptide:

L-Leucyl-glycyl-glycin (L-Leu-gly-gly)

D-Leucyl-glycyl-glycin (D-Leu-gly-gly)

L-Leucyl-glycin (L-Leu-gly)

D-Leucyl-glycin (D-Leu-gly)

L-Leucyl-L-alanin (L-Leu-L-al)

D-Leucyl-L-tyrosin (D-Leu-L-tyr)

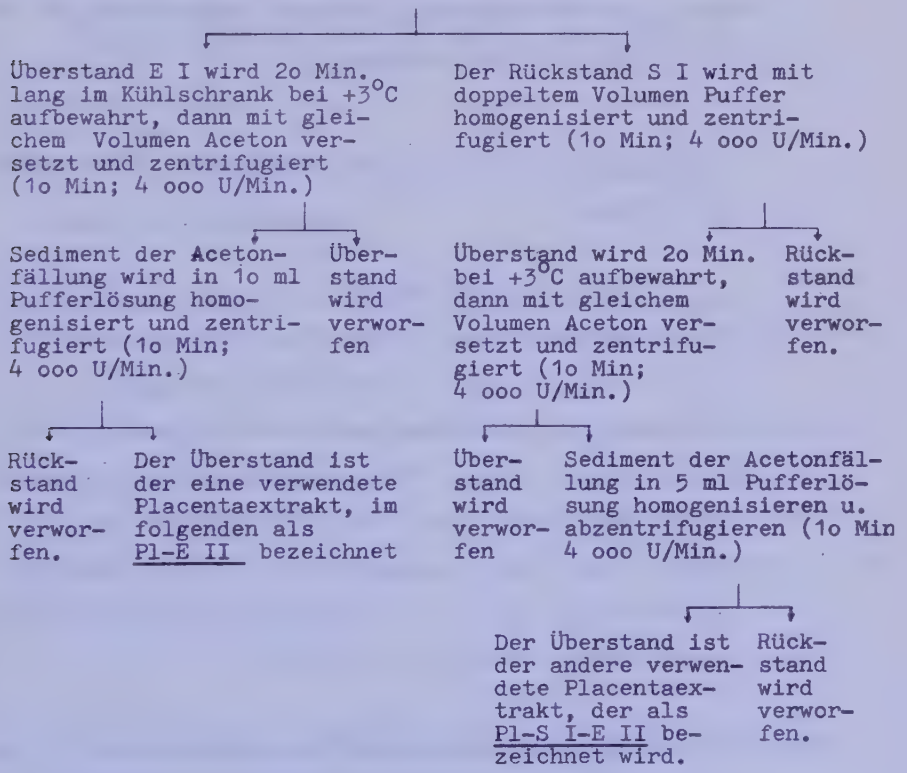
3) L-Prolyl-glycin (L-Pro-gly)

4) Carnosin (ß-Alanyl-L-histidin)

METHODIK

1. Herstellung der Placenta-Extrakte

5o g vom Bindegewebe befreite und vom Blut abgepreßte Placenta werden in 5o ml Aqua bidest. mit Hilfe eines elektrischen Mixers homogenisiert und anschließend 2o Min. lang bei 4 ooo U/Min. abzentrifugiert. Die weitere Aufarbeitung geschieht nach folgendem Schema:



Verwendete Pufferlösungen:

Phosphatpuffer p_H 6,8

TRIS-Puffer p_H 8,2

2. Herstellung der Eihaut-Extrakte

5o g mit Wasser gewaschene Eihaut werden in 5o ml Aqua bidest. ebenfalls mit Hilfe eines elektrischen Mixers homogenisiert und anschließend 2o Minuten lang bei 4 ooo U/Min. abzentrifugiert. Der anfallende Überstand E I wird für einen Teil der Untersuchungen verwendet und als EH-E I bezeichnet.

Der Rückstand unterliegt derselben Aufbereitung wie das Placentagewebe, dabei wird der als EH-SI - E II bezeichnete Extrakt erhalten.

3. Inkubationsansätze und chromatographische Untersuchung der Inkubate

Die Versuchsansätze bestehen aus o,5 ml Extrakt und o,5 ml Substratlösung ($8 \times 1o^{-2}$ mol. für Carnosin; $7,6 \times 1o^{-2}$ mol. für alle anderen Peptide).
Bei Versuchen mit den beiden Placentaextrakten Pl-EII und Pl-SI-EII und dem Eihautextrakt EH-SI-EII werden die Substrate in Wasser aufgelöst. Bei Versuchen mit dem Eihautextrakt EH-EI werden die Substrate in diejenigen Pufferlösungen gelöst, die für die Herstellung der anderen Extrakte verwendet worden sind.

Diese Versuchsansätze werden für die Dauer von 2o Stunden bei 37°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten (t_o, t_1, t_{2o}) werden den Inkubaten jeweils o,o1 ml für die

papierchromatographischen Analysen und o,oo1 ml für die dünnschichtchromatographischen Analysen entnommen und auf Schleicher und Schüll - Papier 2o43 b bzw. auf Glasplatten mit Kieselgel G/Wasser aufgetragen. Anschließend wird ein- oder zweidimensional aufsteigend in bestimmten Fließmittelsystemen (siehe Ergebnisse) chromatographiert und die Chromatogramme mit Ninhydrin angefärbt. Die Auswertung geschieht mit Hilfe von reinen Testsubstanzen.

4. Papierelektrophorese

Die papierelektrophoretische Trennung von Pl-E II (Auftragung o,o5 ml) wird an der Apparatur von BENDER und HOBEIN in TRIS-Puffer p_H 7,2 bei 15o V, 3 mA, +3°C während 16 Stunden durchgeführt. Die Anfärbung der getrennten Proteinfraktionen geschieht mit Ponceau 2 R. Die Auswertung erfolgt mit dem Doppelstrahl-Densitometer für Reflexions- und Transmissionsmessungen "Chromoscan" der Firma Joyce-Loebl.

5. Chromatographische Untersuchung der elektrophoretischen Fraktionen auf Enzymaktivität

Die an Hand des Leitelektropherogramms am ungefärbten Streifen lokalisierten Proteinbanden werden ausge-

schnitten und mit je 1 ml Substratlösung in Puffer für die Dauer von 24 Stunden bei +37°C inkubiert (28). Die Inkubate werden dünnschicht- oder papierchromatographisch auf enzymatische Spaltprodukte hin untersucht (siehe 3.).

Entsprechende Kontrollversuche mit den Extrakten in Wasser (ohne Substratlösung), Substratlösungen in Puffer (ohne Extrakte) und den Papierleerstreifen der Elektrophorese mit Substratlösung zur Beobachtung einer eventuellen Eigenhydrolyse werden ebenfalls durchgeführt.

6. Quantitative Auswertung

a) Neben der halb-quantitativen Aussage, die man an Hand von Testchromatogrammen durch die relative Veränderung der Fleckengröße und Farbintensität des Aminosäure-Ninhydrin-Komplexes treffen kann, wird das durch den Abbau von L-Leucyl-glycyl-glycin freigesetzte Leucin quantitativ papierchromatographisch nach den Methoden von HASCHEN (31, 32), sowie von BLECH und HANSON (33, 34, 35, 36) bestimmt. Hierbei werden nach der Anfärbung der Chromatogramme mit Ninhydrin die Leucinflecken ausgeschnitten und in

methanolischer $CuSO_4$-Lösung eluiert; anschließend wird das Eluat photometriert.

b) Zur Bestimmung der hydrolytischen Spaltung des Carnosins in Histidin und ß-Alanin entweder durch Messung der Abnahme der Carnosinkonzentration oder aber der Zunahme der Konzentration eines seiner Spaltprodukte im Versuchsansatz geben wir der Bestimmung des gebildeten ß-Alanins den Vorzug.

Dazu benutzen wir eine von uns modifizierte Methode, die in der Kombination der Methode von HASCHEN (quantitative Papierchromatographie (32)) und der spektrophotometrischen Methode von ECCLESTON (37) begründet ist.

Die angewandte Bestimmungsmethode beruht auf der Bildung farbiger Cu-Komplexe zwischen Aminosäuren bzw. Peptiden und Kupfersalzen (41). In Vorversuchen wurde nach der ECCLESTON-Methode das Absorptionsmaximum des ß-Alanin-Cu-Komplexes bei 635 nm ermittelt. Das von ECCLESTON benutzte Verfahren, bei dem die gereinigte Enzymlösung direkt mit einem Tripeptid inkubiert und photometriert wird, ist für die Placenta- bzw. Dihautextrakte nicht anwendbar, da diese durch ihre Eigenfarbe die Farbe der Kupferkomplexe

überlagern. Deshalb wird ß-Alanin vor der Überführung in den Cu-Komplex papierchromatographisch von Carnosin und von Histidin abgetrennt. Der nachfolgende Gang der Bestimmung hat gegenüber der HASCHEN-Methode vor allem den Vorzug der Schnelligkeit, da die langwierige Bildung des Ninhydrin-Aminosäure-Komplexes sowie die nachfolgende Bildung des Ninhydrin-Kupfer-Komplexes mit gleichzeitiger Eluierung aus dem Papier entfällt.

Die Inkubationsansätze bestehen aus 1 ml Pl-E II und o,4 ml 16 x $1o^{-2}$ mol. Carnosin in Wasser. Über 24 Stunden lang erfolgt stündlich eine Auftragung von o,o1 ml Inkubat auf Chromatogrammpapier (Startlinie 3 cm oberhalb der Basis, Auftragung im Abstand von 4 cm). Da nach FISCHER und DÖRFEL (38) jeweils nur auf dem Bogen benachbarte Flecken streng miteinander vergleichbar sind, muß neben jeder Auftragung des Inkubats eine ß-Alanin-Testauftragung vorgenommen werden, wobei wir ß-Alanin in steigenden Konzentrationen auftragen, in dem Maße, wie es einer 1o %, 2o %, 3o % bis 1oo % Hydrolyserate des vorgelegten Carnosins entsprechen würde.
Die mit ß-Alanin besetzte erste und letzte Position jedes Papierbogens dient als Leitchromatogramm.

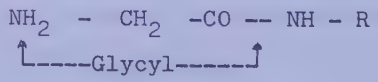
Es wird aufsteigend in dem Fließmittelgemisch n-Butanol:Aethanol:Eisessig:Wasser (8 : 2 : 1 : 3 (39)) chromatographiert. Die Bogen werden luftgetrocknet und die jeweils ersten und letzten Positionen mit Ninhydrin angefärbt. Aus den ungefärbten Bogen werden in Höhe des ß-Alanin 4 cm breite Querstreifen herausgeschnitten und jeweils nach 4 cm - entsprechend den Auftragungen - in der Längsrichtung durchschnitten und zerkleinert in je ein Reagenzglas gelegt. Pro Glas erfolgt die Zugabe von 3 ml gewaschenem Cu-Phosphat (4o); nach dreiminütigem, kräftigem Schütteln werden die Gläser 5 Min. stehen lassen, dann 5 Minuten bei 4 ooo U/Min. zentrifugiert und der Überstand photometrisch bei 635 nm ausgewertet. Es wird gegen Cu-Phosphat und Papierschnitzel ohne ß-Alanin als Leerwert gemessen.
Die Eichkurve wird an Hand der ß-Alanin-Testauftragungen aufgestellt.

ERGEBNISSE

1. Hydrolytische Spaltung von Glycyl-Peptiden

Bekanntlich entstehen Peptide durch Kondensation von Aminosäuren, wobei die Säuregruppe des einen Moleküls sich mit der Aminogruppe des anderen unter Wasserabspaltung und unter Ausbildung der Gruppierung -CO-NH- (Peptidbindung) verbindet. Dabei bleibt bei jedem Peptid je eine Amino- und eine Säuregruppe endständig erhalten. Durch den umgekehrten Vorgang, d.h. durch Wasseraufnahme (hydrolytische Spaltung), werden die Peptidbindungen aufgespalten, wobei die betreffenden freien Aminosäuren entstehen.

Als Glycylpeptide werden solche Peptide bezeichnet, bei denen Glycin das Molekül mit der freien Aminogruppe bildet:



R = jede beliebige Aminosäure.

Von reinen Glycylpeptiden sprechen wir dann, wenn R ebenfalls von Glycin gebildet wird. In diese Gruppierung fallen z.B. Diglycin, Triglycin und Tetraglycin.

Als gemischte Glycylpeptide werden dementsprechend Peptide bezeichnet, bei denen ebenfalls Glycin die Aminosäure mit der freien Aminogruppe darstellt, R jedoch von jeder beliebigen Aminosäure (außer Glycin) gebildet werden kann.

Von den gemischten Glycylpeptiden untersuchen wir: Gly-gly-L-leu und Gly-gly-D-leu, Gly-L-leu und Gly-D-leu, Gly-L-tyr, Gly-L-meth, Gly-L-phe, Gly-L-his, Gly-L-al und Gly-ß-al.

a) Reine Glycylpeptide als Substrate

Gegenüber Tetra-, Tri- und Diglycin als Substrate werden Placentaextrakte Pl-E II und Eihautextrakte EH-E I auf ihre hydrolytische Spaltungsaktivität hin untersucht. Zur Aktivierung der Peptidasen-Aktivität wird den normalen Versuchsansätzen (siehe Methodik 3.) o,1 ml 1 % Co^{2+}-Lösung hinzugefügt (21). Für die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen der Inkubate wird das Fließmittelgemisch n-Butanol: Eisessig:Wasser (4 : 1 : 1) benutzt (39).

Tetraglycin wird durch den Placentaextrakt primär vom Peptidende her unter Glycinabspaltung hydrolysiert - und nicht etwa symmetrisch von der Molekülmitte angegriffen-(Abb. 1) - so daß Triglycin entsteht, das dann weiter über Diglycin und Glycin abgebaut wird. Diglycin selbst wird dann - wie die Inkubation mit Diglycin als Substrat auch beweist - zu Glycin hydrolysiert.

Hingegen zeigt der Milzextrakt (Abb. 1) sogar nach zwanzigstündiger Inkubation mit dem Tetrapeptid nur eine Abspaltung von Glycin, wodurch ebenfalls Triglycin entsteht. Die weitere Hydrolyse des entstandenen Tripeptids (Triglycin) wird wahrscheinlich durch das Substrat gehemmt. Denn bei Vorlage von Triglycin als alleiniges Substrat wird das Tripeptid abgebaut (s. Abb. 1). Beide Extrakte hydrolysieren unter den angegebenen Versuchsbedingungen Tetraglycin nicht vollständig.

Triglycin wird dagegen von beiden Extrakten in etwa gleicher Intensität hydrolytisch in Diglycin und Glycin gespalten (Abb. 1). Die Hydrolyse des vorgelegten Tripeptids geht schneller als diejenige des Tetraglycins vor sich, aber auch hier ist nach 2o Stunden kein vollständiger Substratabbau zu verzeichnen.

Diglycin wird von beiden Gewebeextrakten schon nach einstündiger Inkubation deutlich hydrolysiert. Eine fast vollständige Aufspaltung in Glycin ist nach 2o Stunden festzustellen (Abb. 1).

Die papierelektrophoretische Trennung des Placentaextraktes Pl-E II zeigt nach Auswertung mit dem Doppelstrahldensitometer "Chromoscan" im Gegensatz zu den von SWARD (42) gefundenen 3 Fraktionen deutlich 4 verschieden starke Eiweißfraktionen (Abb. 2), die mit α, β, γ, δ bezeichnet werden. Die anodische α-Fraktion macht mit 39,4 % den größten Anteil aus. Der Anteil der Fraktion ß, die um die Auftragstelle herum liegt, beträgt 23 %, die Anteile der kathodischen Fraktionen γ und δ 18,5 % bzw. 19,1 %.

Aus diesen Versuchen ist die sukzessive Freisetzung von Glycinresten zu erkennen, wobei vom Tetrapeptid primär ein Glycinrest unter Bildung von Triglycin abgespalten wird. Dabei katalysieren die Fraktionen α und γ nur diese Primärreaktion. Das aus dieser Abbaureaktion resultierende Tripeptid wird nicht weiter aufgespalten. In der Fraktion ß sind wahrscheinlich noch solche Peptidasen lokalisiert, welche das gebildete

Triglycin weiter zu Diglycin und dieses wiederum zu Glycin hydrolysieren, so daß nach 20-stündiger Inkubation außer einem Substratfleck nur noch der Glycinfleck zu erkennen ist.

Gegenüber Tetraglycin als Substrat weisen eindeutig die Fraktionen α , β und γ peptidatische Aktivität aus. Fraktion δ ist enzymatisch inaktiv (Abb. 3).

In der nachfolgenden Tabelle sind die Versuchsergebnisse über die hydrolytische Spaltung von reinen Glycylpeptiden zusammengestellt:

Tabelle 1:

Substrat	Enzymatische Aktivität					
	Pl-E II			EH- E I		
	t_o	t_1	t_{2o}	t_o	t_1	t_{2o}
Diglycin	-	++	+++	-	++	+++
Triglycin	-	+	++	-	+	++
Tetraglycin	-	-	++	-	-	++

	Enzymatische Aktivität der papierelektrophoretischen Fraktionen von Pl-E II bei t_{24}			
	α	β	γ	δ
Tetraglycin	++	+++	++	-

Zeichenerklärung: (gilt auch für die nachfolgenden Tabellen).

- : keine enzymatische Aktivität
+ : schwache enzymatische Aktivität (weniger als 2o %ige Substrathydrolyse)
++ : mittlere enzymatische Aktivität (2o - 5o %ige Substrathydrolyse)
+++ : starke enzymatische Aktivität (5o - 8o %ige Substrathydrolyse)
++++ : sehr starke enzymatische Aktivität (8o - 1oo %ige Substrathydrolyse).

b) Gemischte Glycylpeptide als Substrate

1) Placentaextrakt Pl-E II und Eihautextrakt EH-E I werden zunächst auf ihre enzymatische Spaltungsaktivität hin gegenüber Glycyl-glycyl-L-prolin und Glycyl-L-prolin untersucht. Zur Aktivierung der peptidatischen Aktivität wird den normalen Versuchsansätzen (Methodik 3) 0,1 ml 1 % Mn^{2+}-Lösung zugesetzt. Für die dünnschichtchromatographische Trennung der Reaktionsprodukte wird als Fließmittel das Gemisch Phenol : Wasser (75 : 25) benutzt (43).

Wie das Chromatogramm (Abb. 4) eindeutig zeigt, sind schon nach einstündiger Inkubation (t_1) von Placentaextrakt Pl-E II mit Gly-gly-L-pro als Substrat als Reaktionsprodukte Glycyl-L-prolin, Glycin und Prolin neben geringen Mengen intaktem Substrat zu erkennen.

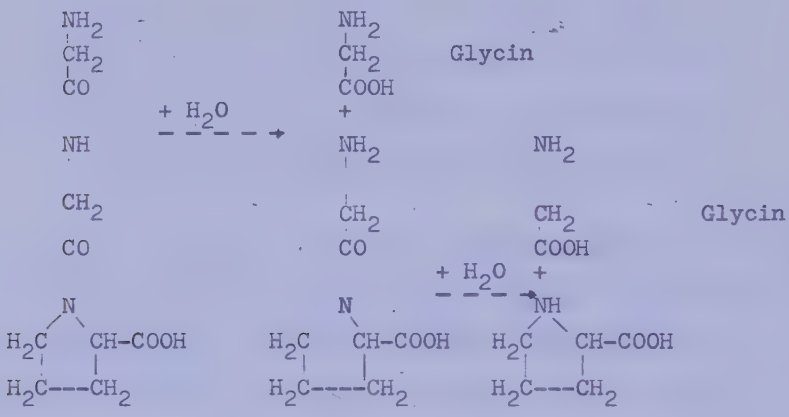
Demnach verläuft der enzymatische Abbau des genannten Tripeptids über die primäre Abspaltung des endständigen Glycinrestes mit einer freien Aminogruppe und nicht etwa über die Abspaltung des endständigen L-Prolins, da intermediär nur das Dipeptid Glycyl-L-

prolin, aber nicht Glycyl-glycin gebildet wird. Das zwischenzeitlich entstehende Gly-L-pro wird dann weiter in Glycin und Prolin hydrolysiert, wie es auch das Chromatogramm des Versuchsansatzes mit diesem Dipeptid als Substrat beweist (Abb. 4). Nach 20-stündiger Inkubation sind sowohl das Tripeptid wie das Dipeptid vollständig zu Glycin und Prolin hydrolysiert.

Die peptidatischen Aktivitäten gegenüber dem Prolin-Tripeptid sind ausschließlich den papierelektrophoretischen Eiweißfraktionen ß und γ des Placentaextraktes Pl-E II zuzuordnen (Abb. 5), wobei die ß-Fraktion die stärkere Aktivität zeigt. Die Fraktionen α und δ sind inaktiv. Auch diese Versuche mit den getrennten Eiweißfraktionen zeigen eindeutig die hydrolytische Aufspaltung des genannten Tripeptids über die primäre Abspaltung von Glycin und anschließender Hydrolyse des Dipeptids in Glycin und L-Prolin.

Die sogar nach 24-stündiger Inkubation unvollständige Hydrolyse des vorgelegten Substrates dokumentiert die gegenüber dem Vollextrakt Pl-E II verminderte Aktivität und rührt von einer partiellen Denaturierung des Eiweißes auf dem Cellulosepapier her.

Der Verlauf der enzymatischen Spaltung von Gly-gly-L-pro ist somit sichergestellt und vollzieht sich nach folgendem Reaktionsschema:



Der Eihautextrakt Eh-E I weist qualitativ und quantitativ gegenüber den oben bezeichneten Peptiden die gleiche Wirkung auf.

Die peptidatischen Wirkungen beider Extrakte sind sowohl gegenüber Glycyl-glycyl-L-prolin als auch gegenüber Glycyl-L-prolin relativ stark ausgeprägt. Die einzelnen Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 2 zusammengestellt:

Tabelle 2:

Substrat	Enzymatische Aktivität					
	Pl-E II			EH-E I		
	t_o	t_1	t_{2o}	t_o	t_1	t_{2o}
Glycyl-L-prolin	-	++	++++	-	++	++++
Glycyl-glycyl-L-prolin	-	++	++++	-	++	++++

	Enzymatische Aktivität der papierelektrophoretischen Fraktionen von Pl-E II bei t_{24}			
	α	β	γ	δ
Glycyl-glycyl-L-prolin	-	++	+	-

(Zeichenerklärung: s. Tabelle 1).

2) Zur Klärung der Frage, inwieweit die Struktur des zweiten Aminosäurerestes einen Einfluß auf die peptidatischen Wirksamkeit ausübt, werden die enzymatischen Aktivitäten der beiden Extrakte gegenüber einer Reihe gemischter Glycyldipeptide untersucht.

Die einzelnen Versuchsansätze werden papier- und dünnschichtchromatographisch in verschiedenen Fließmittelgemischen untersucht.

Diejenigen Glycylpeptide, bei denen die Aminosäurereste R eine aromatische Strukturkomponente enthalten - Glycyl-L-histidin, Glycyl-L-phenylalanin und Glycyl-L-tyrosin - werden sowohl vom Placentaextrakt Pl-E II als auch vom Eihautextrakt EH-E I sehr stark gespalten, wobei nach 24 Stunden alle vorgelegten Substrate vollständig hydrolysiert sind (s. Tabelle 3). Als Fließmittel für die chromatographische Trennung wird für Gly-L-phe und Gly-L-tyr das Gemisch Phenol : Wasser (75 : 25) (43) und für Gly-L-his das Gemisch n-Butanol : Eisessig : Wasser (4 : 1 : 1) (39) benutzt.

Als aliphatische Glycylpeptide untersuchen wir Glycyl-L-methionin, Glycyl-L-alanin, Glycyl-ß-alanin und Glycyldehydro-alanin.

Glycyl-L-methionin wird - ebenso wie die aromatischen Glycylpeptide - vom Placentaextrakt und vom Eihautextrakt bereits nach einer Stunde sehr stark und nach mehreren Stunden (t_{24}) vollständig hydrolysiert (s. Tabelle 3). Hierbei wird als Fließmittel für die

chromatographische Trennung n-Butanol : Äthanol : Eisessig : Wasser (8 : 2 : 1 : 3) (39) verwendet.

Bemerkenswert aber ist die ausgeprägt unterschiedliche Hydrolysegeschwindigkeit der Gewebeextrakte gegenüber den verschiedenen Glycyl-alanin-Dipeptiden. Während Glycyl-L-alanin schon nach einer Stunde vollständig und sogar Glycyl-dehydro-alanin ($\begin{matrix}CH_2\\NH_2\end{matrix}$-CO-NH-$\begin{matrix}C\\CH_2\end{matrix}$-COOH), bei dem die seitliche Methylgruppe zwischen Biuretgruppierung und Carboxylfunktion durch eine Methengruppierung ersetzt ist, von beiden Extrakten weitgehend hydrolysiert werden, wird im Fall von Glycyl-ß-alanin erst nach 24-stündiger Inkubation mit Placentaextrakt lediglich eine gerade eben sichtbare Glycinabspaltung beobachtet. Der Eihautextrakt entfaltet ebenfalls nur eine schwache Peptidase-Wirkung, wenngleich eine etwas stärkere Aktivität, was durch die leicht vergrößerten Glycin und ß-Alanin-Flecken auf den Chromatogrammen zum Ausdruck kommt. Auch die zum Versuchsansatz hinzugefügten Zn^{2+}-Ionen bewirken keine Aktivierung der hydrolytischen Wirkung. Als Fließmittel dient n-Butanol : Eisessig : Wasser (4 : 1 : 1) (39).

Auf die Abbildungen der Chromatogramme der Versuchsansätze der einzelnen Substrate wird aus Raumgründen

verzichtet. Statt dessen werden die Ergebnisse der Untersuchungen in Tabelle 3 aufgezeigt:

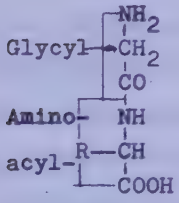
Tabelle 3:

Substrat	Enzymatische Aktivität					
	Pl-E II			EH- E I		
	t_o	t_1	t_{24}	t_o	t_1	t_{24}
Glycyl-L-phenyl-alanin	-	++	++++	-	+++	++++
Glycyl-L-tyrosin	-	+++	++++	-	++	++++
Glycyl-L-histidin	-	+++	++++	-	+++	++++
Glycyl-L-methionin	-	+++	++++	-	+++	++++
Glycyl-L-alanin	-	++++	++++	-	++++	++++
Glycyl-ß-alanin	-	-	(+)	-	-	+
Glycyl-dehydro-alanin	-	+++	++++	-	+++	++++

(Zeichenerklärung s. Tabelle 1).

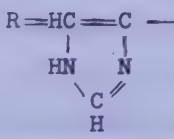
Aus Tabelle 3 geht eindeutig hervor, daß alle vorgelegten Glycyldipeptide mit Ausnahme von Glycyl-ß-alanin von beiden Extrakten in durchaus gleich starkem Umfang hydrolysiert werden. Gly-ß-al unterliegt nur einem sehr schwachen enzymatischen Abbau.

Bei vergleichender Betrachtung der Molekülstrukturen der verwendeten Glycyldipeptide ergibt sich, daß man diese Verbindungen mit Ausnahme von Gly-ß-al als Glycyl-glycin-Derivate ansehen kann, bei denen ein H-Atom durch eine Seitenkette verschiedener Länge und Struktur ersetzt ist.

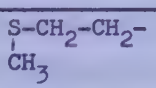


R = - CH_2— **Aminoacyl: Phenylalanin**

R = HO- -CH_2 — **Tyrosin**



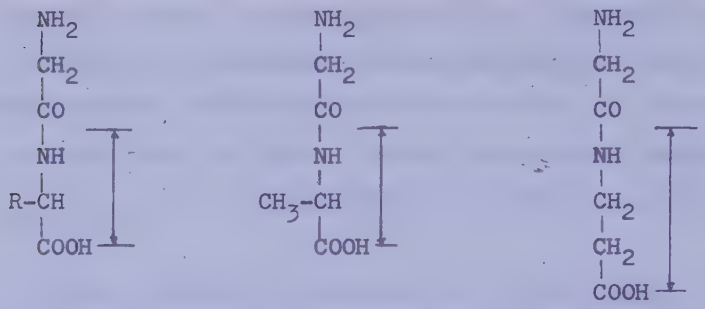
Histidin



Methionin

R = CH_3- **α -Alanin**

R = CH_2= **Dehydro-alanin**



Glycyl-aminoacyl | Glycyl-L-alanin | Glycyl-ß-alanin

Daraus ergibt sich, daß im Fall des geradkettigen Gly-ß-al durch die Intercalation einer Methylengruppe der Abstand zwischen Biuretgruppierung und Carboxylfunktion größer ist als bei den übrigen untersuchten Glycyl-Dipeptiden, welche trotz unterschiedlicher R der Aminoacyl-Komponente etwa gleiche intramolekulare Abstände zwischen beiden Atomgruppierungen aufweisen.

Man kann daher wahrscheinlich annehmen, daß die Struktur des Substituenten R der Aminosäurekomponente der gemischten Glycyl-Dipeptide für ihre hydrolytische Spaltbarkeit von untergeordneter Bedeutung ist, daß vielmehr der intramolekulare Abstand der endständigen Carboxylfunktion von der Peptidbindung (-CO-NH-) ausschlaggebend

ist für die enzymatische Hydrolysierbarkeit.

c) Spaltung von enantiomeren Glycylpeptiden.

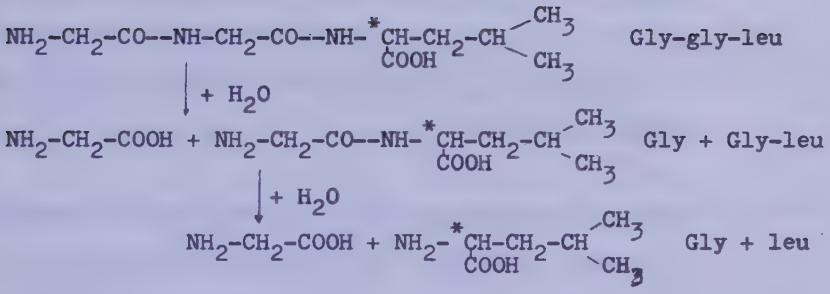
Es interessierte die Frage, ob optisch isomere Glycyl-Peptide, die sich also nur durch ihre Konfiguration unterscheiden, mit unterschiedlicher Geschwindigkeit hydrolysiert werden. Damit wird die Frage nach der optischen Spezifität von Peptidasen aufgeworfen. Als Substrate werden Gly-gly-L-leu und Gly-gly-D-leu sowie die beiden enantiomeren Dipeptide Gly-L-leu und Gly-D-leu herangezogen, deren enzymatische Hydrolyse durch den Placentaextrakt Pl-E II sowie den Eihautextrakt EH-E I untersucht wird. Für die papierchromatographischen Untersuchungen findet als Fließmittel das Gemisch n-Butanol : Äthanol : Essigsäure : Wasser (8 : 2 : 1 : 3) (39) Verwendung.

Beide Extrakte spalten in gleichsinniger Weise sowohl die L- als auch die D-Form des Gly-gly-leu, wobei aber die Hydrolyse der D-Form deutlich langsamer verläuft (Abb. 7 und 8). So ist das L-Tripeptid bereits nach einer Stunde zu mehr als 5o % abgebaut, während das D-Tripeptid erst bei t_{2o} etwa zu 5o % hydro-

lysiert ist. Dagegen ist das L-Tripeptid nach 2o-stündiger Inkubation mit dem Placentaextrakt bzw. dem Eihautextrakt vollständig bzw. zu etwa 9o % in die beiden Bausteine Glycin und Leucin aufgespalten.

An Hand der Chromatogramme (Abb. 7, 8) ist der Verlauf des enzymatischen Abbaus der beiden Tripeptid-Antipoden eindeutig zu erkennen. Besonders deutlich wird der Substratabbau durch die Abbildung eines zweidimensionalen Papierchromatogrammes des Inkubates von Placentaextrakt Pl-E II mit Gly-gly-D-leu bei t_{2o} gekennzeichnet (Abb. 6). Neben dem intakten Substrat (Fleck S) konnten als Reaktionsprodukte Gly-D-leu (Fleck a) sowie Glycin (Fleck b) und Leucin (Fleck c) identifiziert werden.

Die enzymatische Hydrolyse von Gly-gly-D-leu (in gleicher Weise diejenige von Gly-gly-L-leu) verläuft somit primär über die Abspaltung des NH_2-endständigen Glycylrestes und nicht über die des endständigen Leucins mit der freien Carboxylfunktion, da intermediär nicht Glycyl-glycin, sondern das Dipeptid Glycyl-leucin entsteht, welches dann seinerseits in Glycin und Leucin hydrolytisch gespalten wird. Daraus ergibt sich folgendes Abbauschema:



---

*) = asymmetrisches C-Atom.

Die beiden optisch isomeren Dipeptide Gly-L-leu und Gly-D-leu werden als vorgelegte Substrate auch von beiden Extrakten hydrolysiert (Abb. 9,1o), wobei ebenfalls die D-Form nur sehr schwach gespalten wird. Dabei tritt nach 2o-stündiger Inkubation nur eine schwache Abspaltung von Glycin und Leucin ein (weniger als 2o %-ige Substrathydrolyse). Die L-Form hingegen wird von beiden Extrakten außerordentlich schnell hydrolysiert. Bereits zur Zeit t_o ist eine mittlere bis starke Abspaltung (bis zu 5o % bzw. 7o %ige Spaltung) von Leucin und Glycin zu sehen. Das bedeutet, daß der kurze Zeitraum (etwa 1 Minute) zwischen der Zusammengabe von Extrakt und Substratlösung und der sofortigen Entnahme von o,o1 ml zur chromatographischen Auftragung

schon genügt, um eine starke peptidatische Aktivität zu entfalten. Bereits nach einstündiger Inkubation ist das vorgelegte L-Dipeptid vollständig in Glycin und Leucin hydrolysiert.

Die nach elektrophoretischer Auftrennung des Placentaextraktes erhaltenen 4 Fraktionen zeigen nach 24-stündiger Inkubation mit Gly-l-leu eine mäßig aktive α-Fraktion, eine sehr aktive ß-Fraktion - sie spaltet das gesamte vorgelegte Dipeptid - und eine ebenfalls stark enzymatisch wirksame γ-Fraktion. Fraktion δ ist dagegen inaktiv (Abb. 11).

Eine peptidatische Wirkung der vier Eiweißfraktionen gegenüber Gly-D-leu konnte nicht beobachtet werden, was sehr wahrscheinlich auf die Denaturierung der ohnehin äußerst schwach ausgeprägten Aktivität durch das Cellulosepapier zurückzuführen ist.

Die Versuchsergebnisse über die peptidatische Wirksamkeit von Pl-E II und EH-E I gegenüber den optischen Antipoden des Glycyl-Dipeptides sowie des Glycyl-Tripeptides sind in Tabelle 4 zusammengestellt:

Tabelle 4:

Substrat	Enzymatische Aktivität Pl-E II			EH- E I		
	t_o	t_1	t_{2o}	t_o	t_1	t_{2o}
Glycyl-glycyl-L-leucin	-	+++	++++	-	++	++++
Glycyl-glycyl-D-leucin	-	-	++	-	-	++
Glycyl-L-leucin	+++	++++	++++	++	++++	++++
Glycyl-D-leucin	-	-	+	-	-	+

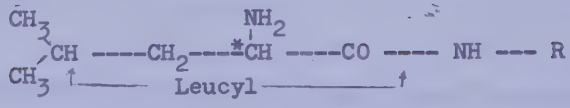
	Enzymatische Aktivität der papierelektrophoretischen Fraktionen von Pl-E II bei t_{24}			
	α	β	γ	δ
Glycyl-L-leucin	++	++++	++++	-
Glycyl-D-leucin	-	-	-	-

(Zeichenerklärung s. Tabelle 1).

2. Hydrolyse von Leucyl-Peptiden.

Als Leucylpeptide sind solche Peptide zu verstehen, in denen Leucin die Aminosäure mit der freien Aminogruppe

darstellt. R kann dabei durch jede beliebige Aminosäure gebildet werden.



*) = asymmetrisches C-Atom.

Da im Leucinrest ein asymmetrisches C-Atom vorhanden ist, interessierte uns vor allem die Frage nach dem optischen Auswahlvermögen der Placentaextrakte gegenüber optischen Antipoden von Leucylpeptiden.

a) Enantiomere Tripeptide als Substrate.

Wir untersuchen zunächst vergleichsweise die peptidatischen Wirkungen von Placentaextrakten (Pl-E II sowie Pl-SI-E II) und Eihautextrakt (EH-E I) gegenüber den L- und D-Antipoden von Leu-gly-gly.

L-leu-gly-gly wird - wie schon aus früheren Untersuchungen bekannt (21) - primär durch die Abspaltung von endständigem L-Leucin hydrolysiert, wobei das Dipeptid Glycyl-glycin entsteht, das dann im weiteren Verlauf der Hydrolyse in Glycin zerfällt (Abb. 12, 13, 14).

Sowohl die beiden Placentaextrakte als auch der Eihautextrakt entfalten erwartungsgemäß eine starke Aktivität gegenüber dem L-Enantiomeren des Leucyl-Tripeptids: nach 2o-stündiger Inkubation sind nur Glycin und Leucin vorhanden. Der enzymatisch aktivste Extrakt ist sicherlich Pl-E II, da schon nach einstündiger Inkubation das gesamte vorgelegte Tripeptid zu Leucin und Glycyl-glycin abgebaut wird (Abb. 12), wobei auch schon aus dem Dipeptid teilweise Glycin entstanden ist.

Wie die Abbildungen 12 bis 14 zeigen, wird D-Leu-gly-gly dagegen von keinem dieser drei Extrakte gespalten. Das D-Enantiomere Leucyl-Tripeptid bleibt unverändert, was durch die vorhandenen intakten Substratflecken sowie durch die fehlenden Aminosäureflecken der Chromatogramme bewiesen wird.

Die Tripeptid - spaltende Aktivität gegenüber L-Leu-gly-gly des Placentaextraktes Pl-E II konnte in den Eiweißfraktionen α, β und γ festgestellt werden (Abb. 15), wobei die Fraktion β die stärkere Tripeptidase-Aktivität aufweist. Fraktion δ zeigt keine

enzymatische Aktivität.

Wie zu erwarten, wird das D-Isomere von keiner Eiweißfraktion hydrolysiert.

Die Untersuchung über die Abhängigkeit der Tripeptidase-Aktivität sowohl des Placentaextraktes Pl-E II als auch des Eihautextraktes EH-E I vom p_H-Wert ergibt ein scharfes p_H-Aktivitäts-Optimum bei 8,o bis 8,2 für beide Extrakte. Dieser Wert für das p_H-Optimum der hydrolytischen Spaltung des L-Leu-gly-gly entspricht den Angaben von HANSON und Mitarbeitern (33,44), die für alle eingesetzten Peptide ein Optimum zwischen p_H 7,8 und 8,3 fanden.

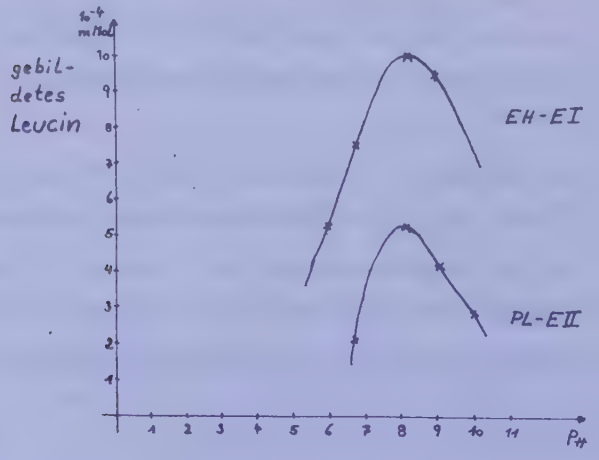


Abbildung 16: p_H-Aktivitätskurve für die hydrolytische Spaltung von L-Leu-gly-gly durch Pl-E II und EH-E I.

Mit Hilfe der quantitativen papierchromatographischen Methodik wurde das durch die Inkubate von Pl-E II bzw. EH-E I mit L-Leu-gly-gly als Substrat freigesetzte Leucin bestimmt.

b) Enantiomere Dipeptide als Substrate.

Die weitere Untersuchung des Placentaextraktes Pl-E II sowie des Eihautextraktes EH-SI-E II auf enzymatische Wirksamkeit gegenüber den enantiomeren Dipeptiden L-Leu-gly und D-Leu-gly ergibt überraschender Weise, daß beide Extrakte, wenn auch mit unterschiedlicher Intensität, sowohl gegenüber dem L-Isomeren als auch gegenüber dem D-Isomeren hydrolytische Aktivität entfalten (Abb. 17, 18).

Die L-Form wird vom Placentaextrakt bereits bei t_o (d.h. also bereits nach etwa 1 Minute) zu ungefähr 5o % hydrolysiert und bei t_1 total abgebaut, während das L-Isomere vom Eihautextrakt erst bei t_{2o} vollständig in L-Leucin und Glycin gespalten ist.

Dagegen ist D-Leu-gly erst nach 2o-stündiger Inkubation mit Placentaextrakt bzw. mit Eihautextrakt zu 5o - 6o % bzw. zu 2o - 3o % in Leucin und Glycin aufgespalten.

Demnach wird also die D-Form von beiden Geweben langsamer angegriffen als die L-Form, wobei der Placentaextrakt eindeutig schneller aufspaltet als der Eihautextrakt.

Außerordentlich interessant erscheint uns die Feststellung, daß die D-Form des Leucyl-Tripeptids von keinem der Extrakte abgebaut, die D-Form des Leucyl-Dipeptids hingegen sowohl vom Placenta- als auch vom Eihautextrakt nach 2o-stündiger Inkubation deutlich hydrolysiert wird, wenn auch in ungleich schwächerem Ausmaß als das entsprechende L-Isomere.

Eine Zusammenfassung der Versuchsergebnisse mit enantiomeren Leucyl-Tri- und -Dipeptiden wird in Tabelle 5 und 6 gegeben.

Tabelle 5:

Substrat	Enzymatische Aktivität					
	Pl-E II			EH-SI - E II		
	t_o	t_1	t_{2o}	t_o	t_1	t_{2o}
L-leucyl-glycin	++	++++	++++	-	++	++++
D-leucyl-glycin	-	-	+++	-	-	++

Tabelle 6:

Substrat	Enzymatische Aktivität								
	Pl-E II			Pl-SI-E II			EH-E I		
	t_o	t_1	t_{2o}	t_o	t_1	t_{2o}	t_o	t_1	t_{2o}
L-leucyl-glycyl-glycin	++	+++	++++	-	++	++++	++	+++	++++
D-leucyl-glycyl-glycin	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	Enzymatische Aktivität der papierchromatographischen Fraktionen von Pl-E II bei t_{24}			
	α	β	δ	σ
L-leucyl-glycyl-glycin	+	++	+	-
D-leucyl-glycyl-glycin	-	-	-	-

(Zeichenerklärung s. Tab. 1).

c) Hydrolyse von L-Leucyl-L-alanin und D-Leucyl-L-tyrosin.

Placenta- und Eihautextrakte spalten L-Leu-L-al rasch in Leucin und Alanin. Ebenso wie im Fall des L-Leu-gly ist nach einstündiger Einwirkungsdauer die gesamte Substratmenge hydrolysiert.

Dagegen beträgt der Hydrolysegrad von D-Leu-L-tyr nach 2o-stündiger Inkubation nur etwa 5o - 6o %. Sobald also der Leucinanteil die D-Konfiguration aufweist, tritt eine Herabsetzung der peptidatischen Aktivität ein.

3. Hydrolytische Spaltung von L-Prolyl-glycin.

Das Chromatogramm in Abb. 4 zeigt, daß L-Pro-gly, das ein typisches Substrat der Iminodipeptidase (22,27) darstellt, vom Placentaextrakt Pl-E II nach einstündiger Einwirkungsdauer bereits etwa zur Hälfte in Prolin und Glycin hydrolysiert ist. Nach 2o-stündiger Inkubation ist das gesamte Substrat gespalten.

4. Hydrolyse von Carnosin (ß-Alanyl-L-histidin).

Die hydrolytische Spaltung dieses Dipeptids, welches einen erheblichen Teil der Extraktivstoffe des Säugetiermuskels ausmacht (45), wird einem spezifischen Ferment, der sogenannten Carnosinase (EC 3.4.3.3. Aminoacyl-L-histidin-Hydrolase) (46) zugeschrieben, das in partiell gereinigter Form aus Schweinenieren dargestellt worden ist (46, 47). Eine Carnosinase-Aktivität ist auch in anderen tierischen Organen, vor allem in Leber, Niere und Milz der Ratte festgestellt worden (46, 48). Schweinedarmmucosa sowie Skelett-, Uterus- und Herzmuskel der Ratte sind hingegen inaktiv (49). KOGA (5o) fand Carnosinase-Aktivität außerdem auch in Lungen, Gehirn und Dünndarm von Kaninchen. FELICETTI und HANSON (51) konnten Spuren einer Carnosinase-Wirkung in Rohextrakten menschlicher Nieren nachweisen. GRUNDIG, FELICETTI und RUMLER (52) konnten auch unter optimalen Bedingungen keine meßbare Hydrolyse von Carnosin in der Frauenmilch nachweisen, fanden jedoch eine deutliche Hydrolyse von Glycyl-L-histidin. Das hauptsächlich im Gänsemuskel vorkommende Anserin, das ein am N_1 des Imidazolringes methyliertes Carnosin darstellt, wird ebenfalls durch die Carnosinase gespalten (53, 54, 55).

Zur Aktivierung der Carnosinase-Wirkung sind Zn^{2+}- oder Mn^{2+}- Ionen erforderlich (49, 56). Metallgifte, wie Cyanid und Sulfid, hemmen daher das Ferment (57). Das p_H-Optimum der Fermentwirkung ist weitgehend von den Bedingungen des Versuches abhängig. In Anwesenheit von Zn^{2+} liegt es bei 7,8 bis 7,9; bei Aktivierung durch Mn^{2+} bei 8,o bis 8,4, während bei Abwesenheit von Metallionen die stärkste Spaltung bei 7,4 bis 7,5 liegt (57).

Eine 3-stündige Präinkubation des Enzyms mit Mn^{2+} in Veronalpuffer p_H 7,75 bei 40^oC vor Zugabe des Substrates führt zur optimalen Spaltung bei p_H 8,o bis 8,4 (49).

Bei unseren Versuchen zeigen sowohl die Placenta- als auch die Eihautextrakte nach 3-stündiger Vorinkubation bei 37^oC mit Mn^{2+} in Veronalpuffer p_H 8,2 eine deutliche Zunahme der Carnosinspaltung gegenüber den nicht vorinkubierten Extrakten. Dagegen bewirkt Präinkubation mit Mn^{2+} eine Verringerung der enzymatischen Aktivität gegenüber Glycyl-L-histidin als Substrat.

Optimale Carnosinspaltung erhalten wir mit Placentaextrakt Pl-E II in Trispuffer p_H 8,2. Für unsere Versuche benutzten wir o,5 ml Extrakt, dem o,4 ml 8 x $1o^{-2}$

molare wässrige L-Carnosinlösung sowie o,1 ml 1 % Mn^{2+}-Lösung hinzugefügt werden. Der Nachweis der enzymatischen Spaltprodukte geschieht dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel G-Platten, wobei als Fließmittelgemisch Methyl-Aethyl-Keton : Pyridin : Wasser : Eisessig (7o : 15 : 15 : 2) (58) dient. An Hand des Chromatogramms (Abb. 19) läßt sich bereits nach einstündiger Inkubation eine deutliche enzymatische Aktivität feststellen: der Carnosinfleck nimmt an Größe und vor allem an Farbintensität ab, es bilden sich Histidin und ß-Alanin, die unter den genannten chromatographischen Bedingungen eindeutig lokalisierbar sind. Nach 2o Stunden ist L-Carnosin gänzlich in seine beiden Aminosäuren-Komponenten zerlegt. Das Racemat D,L-Carnosin hingegen wird nach 2o Stunden nur zu etwa 5o % hydrolytisch abgebaut, was darauf zurückzuführen ist, daß die D-Form überhaupt nicht oder nur sehr schwach gespalten wird.

Von den vier elektrophoretischen Eiweißfraktionen des Placentaextraktes Pl-E II weisen nur die beiden Fraktionen ß und γ Carnosinase-Wirkung auf, wobei als Reaktionsprodukte Histidin und ß-Alanin identifiziert werden können. Die Fraktionen α und δ sind gegenüber Carnosin enzymatisch inaktiv (Abb. 2o).

Um das Ausmaß der durch Mn^{2+}-Zusatz bewirkten Aktivierung der Carnosin-Spaltung näher zu ermitteln, wird in den Inkubaten von L-Carnosin mit Placentaextrakt das freigesetzte ß-Alanin quantitativ (Methodik 6.b)) mit und ohne Zusatz von Mn^{2+}-Ionen bestimmt. Während der durch Mn^{2+}-Zusatz aktivierte Extrakt sofort eine hydrolytische Wirkung gegenüber dem Substrat entfaltet, die nach 2 Stunden im sicher meßbaren Bereich liegt - und einer Hydrolyserate von etwa 25 % entspricht - und die nach 12 Stunden zu einer vollständigen Hydrolyse des vorgelegten L-Carnosin führt, verhält sich der nicht aktivierte Placentaextrakt anders. Bei Abwesenheit von Mn^{2+}-Ionen läßt sich die Hydrolyse des L-Carnosins erst nach 1o Stunden quantitativ erfassen, wobei die nachfolgende meßbare Hydrolysegeschwindigkeit langsam verläuft. Nach 24-stündiger Inkubation ist erst eine Substrathydrolyse von etwa 65 % zu verzeichnen.

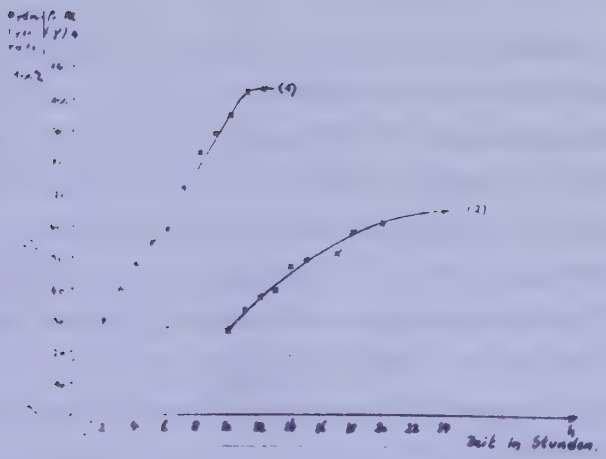


Abb. 21: Enzymatische Spaltung von L-Carnosin durch Pl-E II in Gegenwart von Mn^{2+}-Ionen (Kurve 1) und ohne Mn^{2+} (Kurve 2).

Der Eihautextrakt entfaltet Carnosin gegenüber die gleiche hydrolytische Wirksamkeit wie der Placentaextrakt, die Hydrolysegeschwindigkeit verläuft jedoch etwas langsamer.

5. Diskussion der Ergebnisse.

Zur Untersuchung der peptidatischen Eigenschaften von menschlichem Placentagewebe und Eihäuten wurden vornehmlich die als Pl-E II und EH-E I bezeichneten Extrakte verwandt. Während zur Gewinnung des Eihautextraktes lediglich die zerkleinerte Eihaut in Wasser homogenisiert und abzentrifugiert wurde, fällten wir die löslichen Anteile des wässrigen Placentahomogenates mit Aceton, um eine Anreicherung der Eiweißstoffe zu erzielen, welche weitgehend frei sind von wasserlöslichen, niedermolekularen Begleitstoffen, wie beispielsweise Peptide und Aminosäuren. Eine Denaturierung der Eiweißkörper wird durch die Ausführung der Acetonfällung bei $+2^{\circ}$ bis $+4^{\circ}C$ vermieden.

Trotz der relativ unterschiedlichen Gewinnung der beiden Extrakte sind in ihren peptidatischen Wirkungen in qualitativer Hinsicht keine Unterschiede festzustellen. Die beim Placentaextrakt E II beobachtete größere peptidatische Aktivität kann sehr wahrscheinlich auf eine Proteinanreicherung zurückgeführt werden. Die vorliegenden Untersuchungen lassen mit großer Wahrscheinlichkeit die Annahme zu, daß Placenta und Eihaut ein zumindest qualitativ gleichartiges Peptidase-Muster aufweisen.

GRASSMANN (6o) und WALDSCHMIDT-LEITZ (61) konnten zeigen, daß die dipeptidspaltenden Enzyme - die sogenannten Dipeptidasen - verschieden sind von den Enzymen, die Tripeptide und höhere Peptide angreifen (Polypeptidasen) (62). Dipeptidasen benötigen zu ihrer Wirkung Substrate, die in Nachbarschaft der zu spaltenden Peptidbindung sowohl eine freie NH_2-Gruppe als auch eine freie COOH-Gruppe aufweisen (63), wohingegen für die Polypeptidasen zwei Haftpunkte genügen, also außer der sensitiven Peptidbindung eine freie COOH-Gruppe (Carboxypeptidase) (64) oder eine freie NH_2-Gruppe (Aminopeptidase) (65) in Nachbarschaft zur aufzuspaltenden Peptidbindung.

Auf Grund der von HANSON (66) vorgenommenen Einteilung der Peptidasen nach der chemischen Struktur der Substrate kann man zwischen den folgenden Dipeptidasen unterscheiden: Gly-gly-dipeptidasen (22, 25), Gly-L-leu-dipeptidasen (25, 26), Prolidasen (spezifisches Substrat Prolyl-Peptide) (22, 27), Prolinasen (spezifisches Substrat endständiger Prolinanteil) (67), Carnosinasen (46), L-Leu-aminopeptidasen (22, 69, 7o) und schließlich Dehydropeptidasen (68). Die Substratspezifität dieser Peptidasen ist eher gruppenspezifisch.

Da die Extrakte aus Placenta und Eihaut sowohl Gly-gly, Gly-L-leu und Gly-L-pro als auch L-Pro-gly, Carnosin, L-Leu-gly sowie Gly-dh-al hydrolysieren, kann man durchaus das Vorliegen dieser verschiedenen Dipeptidasen annehmen. Außer Glycyl- und Leucyldipeptiden werden auch Tetra- und Triglycin, Gly-gly-L-pro, Gly-gly-L-leu sowie L-Leu-gly-gly hydrolytisch abgebaut, was auf das Vorkommen von relativ unspezifischen Aminopeptidasen (22, 23, 24, 71) in Placenta- und Eihautextrakt hindeutet.

Die Aminopeptidasen sind gekennzeichnet durch ihr Angreifen am N-terminalen Ende der Peptidkette unter hydrolytischer Aufspaltung der Peptidbindung, die also der N-terminalen Aminosäure mit freier NH_2-Gruppe benachbart ist, wobei die Kettenlänge des Substrates ein die Geschwindigkeit beeinflussender Faktor ist. Andererseits spricht die Hydrolyse von Leucylpeptiden wie L-Leu-gly, L-Leu-gly-gly, L-Leu-L-al sowie D-Leu-L-tyr dafür, daß in beiden Gewebsextrakten auch Enzyme enthalten sind, die Eigenschaften einer Leucinaminopeptidase besitzen, welche unabhängig von der Kettenlänge des Substrates bevorzugt N-terminal stehendes L-Leucin abspaltet (49). Durch die chromatographische Erfassung der Intermediärprodukte (wie Gly-L-pro,

Gly-L-leu, Gly-gly) beim Abbau der Tripeptide, ist der Verlauf der enzymatischen Hydrolyse vom N-terminalen Ende her eindeutig bewiesen. Damit wird eine Hydrolyse vom C-terminalen Ende her ausgeschlossen.

Die Befunde über die Carnosinspaltung und deren Aktivierung durch Mn^{2+}-Ionen sowie die Tatsache, daß Gly-L-his sehr stark hydrolysiert und durch Mn^{2+} nicht aktiviert wird, machen das Vorliegen einer typischen Carnosinase im Sinne der Klassifizierung von HANSON und SMITH (46, 47) im Placenta- sowie im Eihautextrakt sehr wahrscheinlich.
Eine Isolierung und Reindarstellung des Carnosin - spaltenden Enzyms war durch diese Versuche nicht beabsichtigt.

Die papierelektrophoretische Auftrennung der Eiweißkörper der Acetonfällung des Placentaextraktes (Pl-E II) in vier Fraktionen gestattet nur eine partielle Abgrenzung der verschiedenen Peptidase-Wirkungen, so kann die Dipeptidase, die Carnosinase- sowie die Tripeptidase-Aktivität in den Fraktionen ß und γ lokalisiert werden. Dagegen entfaltet die α-Fraktion gegenüber Carnosin und Gly-gly-L-pro keine enzymatische Aktivität, gegenüber anderen Substraten zeigt sie jedoch das gleiche hydrolytische Verhalten wie die Fraktionen ß und γ.

In jedem Fall ist die α-Fraktion peptidatisch unwirksam. Eine eindeutige Abgrenzung von einzelnen, spezifischen Exopeptidasen ist somit nicht möglich. Die erhaltenen Proteinbanden stellen auch keineswegs homogene, sondern sicher heterogene Enzymfraktionen dar. Zudem ist bekannt, daß die verschiedenen Di- und Tripeptidasen keine streng spezifischen Fermente, sondern eher gruppenspezifische Enzyme darstellen (66).

Außerdem interessierte uns die Frage nach dem Vorliegen von D-Peptidasen. Nach AMMON und DIRSCHERL (59) sind bis heute keine D-Peptidasen isoliert worden. Ihre Existenz ist auch nicht exakt bewiesen, denn bisher ist es nicht gelungen, D-Peptidasepräparationen von absoluter sterischer Spezifität zu erhalten, die frei sind von L-Peptidase- oder Dehydropeptidasewirkungen (66).

Andererseits ist an der Spaltbarkeit von D-Peptiden durch körpereigene Fermente nicht zu zweifeln, was durch die Untersuchungen von BERGMANN (72), WALDSCHMIDT-LEITZ (73), HANSON (46), ABDERHALDEN (74) und SMITH (75) bewiesen ist; auch unsere eigenen Untersuchungen bestätigen diese Ergebnisse. Für das Vorkommen selbständiger D-Peptidasen sprechen die Versuche von BAMANN und SCHIMKE (76) und diejenigen von BAYERLE und Mitarbeiter (77). Die Autoren weisen jedoch darauf hin, daß

die Existenz besonderer D-Peptidasen mit absoluter optischer Spezifität damit noch nicht genügend gesichert sei. Eine zusammenfassende Darstellung über das Problem der D-Peptidasen geben HANSON und FELICETTI (66), vervollständigt durch neue Untersuchungen über Gly-D-leu- und D-Leu-gly-gly-Peptidasen (78). Diese Autoren sind ebenfalls der Meinung, daß eine strenge Unterscheidung zwischen L- und D-Peptidasen nicht zu treffen ist.

Wir fanden bei unseren Untersuchungen, daß Gly-gly-D-leu ebenso wie Gly-D-leu enzymatisch gespalten wird, wohingegen D-Leu-gly-gly nicht hydrolysiert wird. D-Leu-gly und D-Leu-L-tyr wiederum werden angegriffen. Auch hieraus kann nicht unbedingt auf das Fehlen oder Vorhandensein der entsprechenden D-Peptidasen geschlossen werden. Vielmehr kann man auch annehmen, daß diese Substrate mit D-Konfigurationen ebenfalls durch L-Peptidasen enzymatisch mitgespalten werden, wobei die reine L-Komponente wesentlich rascher hydrolysiert wird.

Ob nur die größere Seitenkette in der abzuspaltenden D-Aminosäure (D-Leucin) dafür verantwortlich ist, daß D-Leu-gly-gly nicht enzymatisch abgebaut wird, obwohl

dies für die Spaltbarkeit des betreffenden Dipeptids ohne Einfluß ist, bleibt in Frage gestellt (72, 79).

Gerade diese letzten Befunde deuten in gewisser Hinsicht auf die Möglichkeit hin, daß tatsächlich im Placentagewebe - wenn auch in sehr geringer Konzentration - echte D-Peptidasen vorkommen könnten. Auch die Beobachtung, daß keine der vier, durch die elektrophoretische Auftrennung des Placentaextraktes erhaltenen Eiweißfraktionen z.B. Gly-gly-D-leu oder Gly-D-leu hydrolysiert, stützt diese Annahme. Man kann der Auffassung sein, daß die in geringen Mengen vorliegenden D-Peptidasen wesentlich empfindlicher in ihrer Tertiär-Struktur sind als die normalen L-Peptidasen und deshalb schneller auf Cellulosepapier denaturieren. Daher ist auch in diesen Fällen keine enzymatische Aktivität zu beobachten.
Zur endgültigen Klärung dieser Frage können nur Isolierung und Reindarstellung dieser Enzyme beitragen.

Tabelle 7: Zusammenfassung der verschiedenen Ergebnisse.

Substrat	Enzymatische Aktivität	
	Placentaextrakt t_{20}	Eihautextrakt t_{20}
Tetraglycin	++	++
Triglycin	++	++
Diglycin	+++	+++
Glycyl-glycyl-L-prolin	++++	++++
Glycyl-L-prolin	++++	++++
Glycyl-L-tyrosin	++++	++++
Glycyl-L-phenylalanin	++++	++++
Glycyl-L-histidin	++++	++++
Glycyl-L-methionin	++++	++++
Glycyl-L-alanin	++++	++++
Glycyl-ß-alanin	+	+
Glycyl-dehydro-alanin	++++	++++
Glycyl-glycyl-L-leucin	++++	++++
Glycyl-glycyl-D-leucin	++	++
Glycyl-L-leucin	++++	++++
Glycyl-D-leucin	++	+

Fortsetzung Tabelle 7:

Substrat	Enzymatische Aktivität	
	Placentaextrakt	Eihautextrakt
	t_{2o}	t_{2o}
L-Leucyl-glycyl-glycin	++++	++++
D-Leucyl-glycyl-glycin	-	-
L-Leucyl-glycin	++++	++++
D-Leucyl-glycin	++	++
L-Leucyl-L-alanin	++++	++++
D-Leucyl-L-tyrosin	+++	+++
L-prolyl-glycin	++++	+++
Carnosin	++++	+++

Zeichenerklärung:

- : keine enzymatische Aktivität
+ : schwache enzymatische Aktivität (weniger als 2o %-ige Substrathydrolyse)
++ : mittlere enzymatische Aktivität (2o-5o %ige Substrathydrolyse)
+++ : starke enzymatische Aktivität (5o-8o %ige Substrathydrolyse)
++++ : sehr starke enzymatische Aktivität (8o-1oo %ige Substrathydrolyse).

D. ZUSAMMENFASSUNG

Es werden Untersuchungen mit Homogenaten menschlicher Placenta und Eihäuten in ihrem enzymatischen Verhalten verschiedenen Di-, Tri- und einem Tetrapeptid gegenüber dargestellt. Mit Hilfe papier- und dünnschichtchromatographischer Methoden wird die hydrolytische Spaltung verschiedener Glycyl- und Leucyl-Peptide sowie von L-Prolyl-glycin und Carnosin untersucht. Während alle untersuchten L-Peptide bereits nach einstündiger Inkubation mit den genannten Gewebsextrakten, aber spätestens nach 2o Stunden einer zum Teil vollständigen Hydrolyse unterliegen, wird Glycyl-ß-alanin nur in ganz geringem Ausmaß gespalten, was auf den größeren intramolekularen Abstand der endständigen Carboxylfunktion von der CO-NH-Peptidbildung zurückgeführt wird.

Die enzymatische Hydrolyse der untersuchten Tripeptide Glycyl-glycyl-leucin, Glycyl-glycyl-prolin, Glycyl-glycyl-glycin und Leucyl-glycyl-glycin erfolgt jeweils von der terminalen Aminosäure mit der freien Aminogruppe her, was durch die chromatographische Erfassung der Intermediärprodukte sicher nachgewiesen wird.

Das Verhalten der Extrakte gegenüber den L- und D-Isomeren von Glycyl- und Leucyl-Peptiden wird gesondert untersucht. Während alle L-Peptide (Glycyl-glycyl-L-leucin, Glycyl-L-leucin, L-Leucyl-glycyl-glycin, L-leucyl-glycin) sehr rasch hydrolytisch abgebaut werden, vollzieht sich die enzymatische Aufspaltung der entsprechenden D-Enantiomeren nur sehr langsam und in wesentlich geringerem Umfang. Dabei wird D-Leu-gly-gly im Gegensatz zu Gly-Gly-D-leu und D-Leu-gly überhaupt nicht abgebaut.

Für den enzymatischen Abbau von L-Leucyl-glycyl-glycin durch Placenta- und Eihautextrakte wird durch Bestimmung des freigesetzten Leucins mit Hilfe der quantitativen papierchromatographischen Methodik ein scharfes p_H-Aktivitäts-Optimum bei 8,o bis 8,2 gefunden.

Die Eiweißkörper der Acetonfällung des Placentaextraktes werden papierelektrophoretisch in vier Fraktionen (α, β, γ, δ) aufgetrennt und jede Fraktion in ihrem enzymatischen Verhalten den verschiedenen Peptiden gegenüber untersucht. Dadurch gelingt eine partielle Abgrenzung der verschiedenen Peptidase-Wirkungen.

Die enzymatische Spaltung von Carnosin (ß-Alanyl-L-histidin) wird qualitativ mit den bereits angeführten Methoden (Papier- und Dünnschichtchromatographie), quantitativ mit einer neuen, von uns modifizierten papierchromatographisch - photometrischen Methode untersucht. Dabei wird der Zeitaufwand der bekannten quantitativ - papierchromatographischen Methoden von 3 Stunden durch Kombination mit einer reinen spektrophotometrischen Methode auf 13 Minuten verkürzt bei keinesfalls größerer Fehlerbreite. Für die Carnosinspaltung wird die deutliche Abhängigkeit der Hydrolysegeschwindigkeit und -vollständigkeit von der Aktivierung der Enzymlösungen mit Mn^{2+}-Ionen mit Hilfe dieser Methode nachgewiesen. Die Carnosinaseaktivität konnte eindeutig den zwei papierelektrophoretischen Fraktionen ß und γ zugeordnet werden.

Die Tatsache, daß Placenta- und Eihautextrakt in qualitativer, wie auch weitgehend in quantitativer Hinsicht dieselben peptidspaltenden Aktivitäten aufweisen, macht das Vorliegen eines zumindest qualitativ gleichartigen Peptidase-Musters in Placenta und Eihaut sehr wahrscheinlich.

E. LITERATUR

1. UFER, J.: Hormontherapie in der Frauenheilkunde. De Gruyter Verlag Berlin, 1966, S. 35

2. GRUMBACH, M.M., S.T. KAPLAN: Transact. N.Y.Acad.Sc. 27, 167 (1964)

3. ASSALI, N.S., J. HAMERMESZ: J.Endocr. 55, 561 (1954)

4. NELLER, R., G. STARK: Experienta 17, 51o (1961)

5. SALHANICK, H.A., J.E. JONES, D. BERLINER: Fed.Proc. 15, 16o (1956)

6. BERLINER, D., J. JONES, H.A.SALHANICK: J.Biol.Chem. 223, 1o43 (1956)

7. TROEN, P.: J.clin.Endocr. 21, 1511 (1961)

8. DICZFALUSY, E., P. TROEN: Vitam. and Horm. 19, 287 (196o)

9. GROSSER/ORTMANN: Grundriß der Entwicklungsgeschichte des Menschen. Springer Verlag, Heidelberg, 1966, S. 72

1o. FRANKEN, H.: Zbl. Gynäk. 76, 19 (1954)

11. STERNBERG, J.: Gynéc.Obstét. 59, 187 - 217 (196o)

12. STRAUSS, F.: Bau und Funktion der menschlichen Placenta. in: Fortschritte der Geburtshilfe u. Gynäkologie 17, 3 (1964)

13. BERGSMA, H.D.: Birth Defects Original Article Series 1, 1 (1965)

14. TUPPY, H.: in: R. CALDEYRO-BARCIA, H. HELLER: Oxytocin. Pergamon-Press, N.Y., 1961, S. 315

15. FIDENZA, A.: Boll.Soc.Ital.Biol.Sper. 25, 1o28 (1949)

16. FIDENZA, A., A. VESCIA: Boll.Soc.Ital.Biol.Sper. 25, 46 (1949)

17. ABDERHALDEN, R., E. ABDERHALDEN: Fermentforschung 16, 445 (1942)

18. IWIG, M., R. HASCHEN: Acta biol.med.german. 14, 589-592 (1965)

19. VESCIA, A., A. FIDENZA: Boll.Soc.Ital.Biol.Sper. 24, 823 (194

2o. BEKAL, J.F.: Arch.Biochem.Biophys. 111, 335-343 (1965)

21. ZOCH, E.: Ann.Sarav. Univ. XIII, 2, 7o f. (1966)

22. SMITH, E.L.: Advances Enzymol. 12, 191 (1951)

23. AGREN, G.: Acta physiol. Scand. 8, 369 (1944)

24. AGREN, G.: Acta physiol. Scand. 9, 255 (1954)

25. SMITH, E.L.: The Enzymes, 4,8 (196o) Acad.Press. Inc. N.Y.

26. SMITH, E.L.: J.Biol.Chem. 176, 9 (1948)

27. DAVIS, N.C., E.L. SMITH: J.Biol.Chem. 267, 4o (1957)

28. ZOCH, E.: Enzymologia 28, 325-332 (1965)

29. STAHL, E.: Dünnschichtchromatographie. Springer Verlag, Heidelberg, 1962

3o. RANDERATH, K.: Dünnschichtchromatographie. Verlag Chemie, Weinheim, 2.Aufl. 1965

31. HASCHEN, R.J.: Pharmazie 9, 824 (1954)

32. HASCHEN, R.J.: Clin.Chim. Acta 1, 242-254 (1956)

33. BLECH, W., H. HANSON: Zschr.physiol.Chem. 315, 181-19o (1959)

34. BLECH, W., H. HANSON: Zschr.physiol.Chem. 315, 191-195 (1959)

35. BLECH, W., H. HANSON: Zschr.physiol.Chem. 337, 196 (1964)

36. BLECH, W., H. HANSON: Zschr.physiol.Chem. 348, 1477-1485 (1967)

37. ECCLESTON, J.F.: Biochim.Biophys.Acta 139, 186-187 (1967)

38. FISCHER, F.G., H. DÖRFEL: Biochem.Zschr. 324, 544 (1953)

39. AUGUSTINSSON, K.B., M. GRAHN: Acta Chem.Scand. 7, 9o6 (1953)

4o. SCHROEDER, W.A., L.M. KAY, R.S. MILLS: Anal.Chem. 22, 76o (195o)

41. SPIES, R.J.: Methods in Enzymology, Vol. 3, S. 471 (1957), Acad.Press, N.Y.

42. SWARD, J.: Zbl. Gynäk. 25, 857 (1968)

43. CHECCHI, J., DE RICHARDI: Bull.Soc.Ital.Farm.Ospital 7, 165 (1961)

44. HANSON, H.: Beiheft der Zeitschrift "Die Kulturpflanze", Akademieverlag, Berlin, 1956

45. GUGGENHEIM, M.: Die biogenen Amine. 4.Aufl., S. 438 Verlag S. Karger, Basel, 1951

46. HANSON, H., E.L. SMITH: J.Biol.Chem. 179, 789 (1949)

47. ROSENBERG, A.: Arch.Biochem. 88, 83 (196o)

48. GARKOVI, P.G.: Bull.Biol.Med. USSR 4, 57 (1937)

49. HOPPE-SEYLER, THIERFELDER: Handbuch d.Physiologischen und Pathologisch-Chemischen Analyse. Springer Verlag, Heidelberg, 1966, VI/C. S. 46-199

5o. KOGA, KAGAYUKI: Nickidai Igaku Zasshi 18, 3o8-317 (19
Chem.Abstr. 61, 8696 (1964)

51. FELICETTI, D., H. HANSON: Zschr.physiol.Chem. 349, 555-564 (1968)

52. GRUNDIG, CH.A., D.FELICETTI, W. RUMLER: Zschr.physiol.Chem. 348, 51-6o (1967)

53. DAVIS, N.C.: J.Biol.Chem. 223, 935 (1956)

54. JONES, N.B.: Biochem. J. 64, 2o (1956)

55. PARSHIN, A.N., U. DOLNISKAJA: Bull.Biol.Med.exp.USSR 4, 5o (1937)

56. BOYER, LARDY, MYRBÄCK: The Enzymes, 4, 9 (196o) Acad.Press, N.Y.

57. HOFMANN-OSTERHOF: Enzymologie. S. 3o5, Springer Verlag, Heidelberg, 1954

58. FAHMY, A.R., A. NIEDERWIESER, G. PATAKI, M. BRENNER: Helv.Chim. Acta 44, 2o22 (1966)

59. AMMON, R., W. DIRSCHERL: Fermente, Hormone, Vitamine. Thieme Verlag, Stuttgart, 1959, 1, 275

6o. GRASSMANN, W.: Zschr.physiol.Chem. 167, 2o2 (1928)

61. WALDSCHMIDT-LEITZ, W. GRASSMANN, u. SCHATTER: Ber. dtsch. chem.Ges. 6o, 19o6 (1927)

62. FRUTON, J.S., G.W. IRWING jr., M. BERGMANN: Biol.Chem. 138, 249 (1941)

63. BERGMANN, M.: Adv. Enzymol. 2, 49 (1942)

64. SMITH, E.L., M. BERGMANN: J.Biol.Chem. 138, 789 (1941)

65. GRASSMANN, W.: Ergebn.Enzymforschung 1, 129 (1932)

66. HANSON, H.: in: HOPPE-SEYLER/THIERFELDER: Handbuch der Physiologischen und Pathologisch-Chemischen Analyse. VI/C, S. 1-9. Springer Verlag, Heidelberg, 1966

67. GRASSMANN, W.: Zschr.physiol.Chem. 21o, 1 (1932)

68. CAMPBELL, B.J., Y.CH. LIU: Biochim. et Biophys. Acta 118, 371 (1966)

69. SMITH, E.L., D.H. SPACKMAN: J.Biol.Chem. 212, 271 (1955)

7o. SMITH, E.L., R.L. HILL: The Enzymes, 4, 37 (196o) Acad.Press.Inc. N.Y.

71. JOHNSON, M.J.: J.Biol.Chem. 137, 575 (1941)

72. BERGMANN, M., S. ZERVAS, J.S. FRUTON: J.Biol.Chem. 1o9, 325 (1935)

73. WALDSCHMIDT-LEITZ, H. MAYER: Zschr.physiol.Chem. 262, 4 (1939)

74. ABDERHALDEN, R., E. ABDERHALDEN: Zschr.physiol.Chem. 265, 253-27o (194o)

75. SMITH, E.L., J. POLYGLASE: J.Biol.Chem. 18o, 12o9 (1949) 199, 8o1 (1952)

76. BAMANN u. SCHIMKE: Naturwissenschaften 29, 558 (1941)

77. BAYERLE,RIEFFERT: Biochem.Zschr. 311, 73 (1942)

78. HANSON, H., D. FELICETTI: Zschr.physiol.Chem. 349, 555-564 (1968)

79. BERGMANN, M., J.S. FRUTON: J.Biol.Chem. 117, 189 (1937)

F. ANHANG: Abbildungen der Chromatogramme.

Abb. 1: Dünnschichtchromatogramm der Inkubate von Pl-E II bzw. EH-E I mit verschiedenen reinen Glycyl-Peptiden als Substrate zu den Zeiten t_o, t_1, t_{2o}.

a = Glycin

b = Diglycin

c = Triglycin

d = Tetraglycin

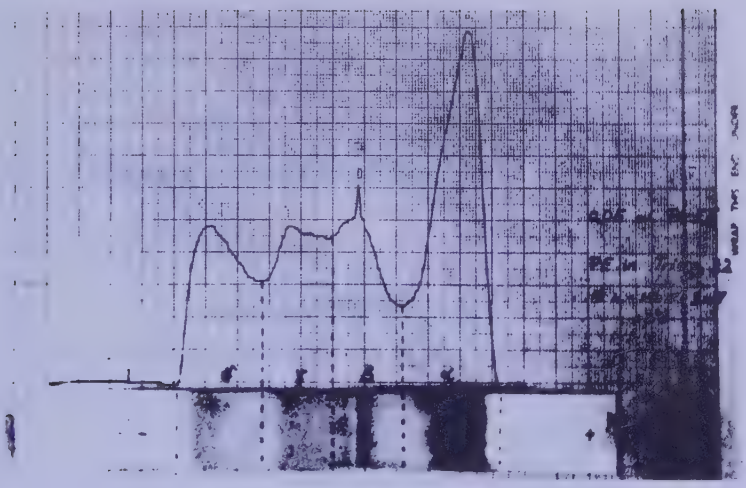


Abb. 2: Papierelektropherogramm von Pl-E II (TRIS-Puffer p_H 7,2) mit den Fraktionen α, β, γ, δ.

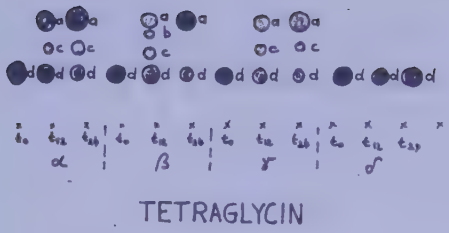


Abb. 3: Dünnschichtchromatogramm der Inkubate der papierelektrophoretischen Fraktionen von Pl-E II (α, β, γ, δ) mit Tetraglycin als Substrat zu den Zeiten t_0, t_{12}, t_{24}.

a = Glycin

b = Diglycin

c = Triglycin

d = Tetraglycin

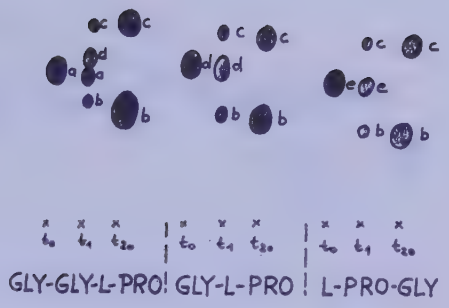


Abb. 4: Dünnschichtchromatogramm der Inkubate von Pl-E II mit Gly-gly-L-pro, Gly-L-pro und L-Pro-gly als Substrate zu den Zeiten t_o, t_1, t_{2o}.

a = Gly-gly-L-pro

b = Glycin

c = Prolin

d = Gly-L-pro

e = L-Pro-gly

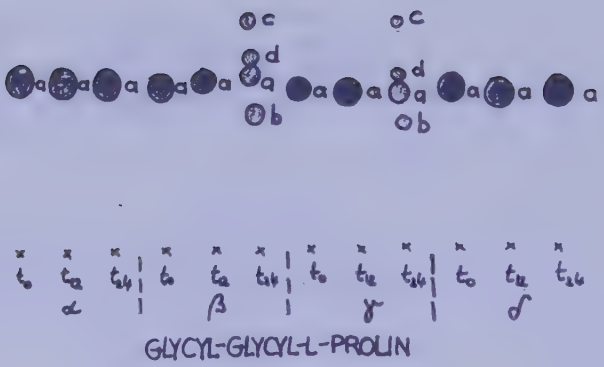


Abb. 5: Dünnschichtchromatogramm der Inkubate der papierelektrophoretischen Fraktionen von Pl-E II (α, β, γ, δ) mit Gly-gly-L-pro als Substrat zu den Zeiten t_o, t_{12}, t_{24}.

a = Gly-gly-L-pro

b = Glycin

c = Prolin

d = Gly-L-pro

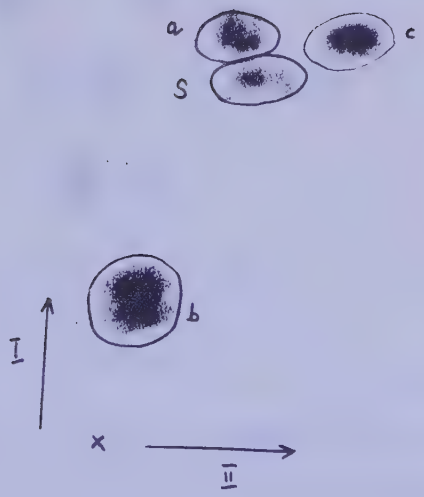


Abb. 6: Zweidimensionales Papierchromatogramm des Inkubates von Pl-E II mit Gly-gly-D-leu als Substrat zur Zeit t_{20}.

I. Dimension: n-Butanol:Äthanol:Essigsäure:Wasser (8 : 2 : 1 : 3)
II.Dimension: α-Picolin:Eisessig:Wasser (75 : 2 : 23)

S = Gly-Gly-D-leu
a = Gly-D-leu
b = Glycin
c = Leucin
(x markiert die Auftragstelle).

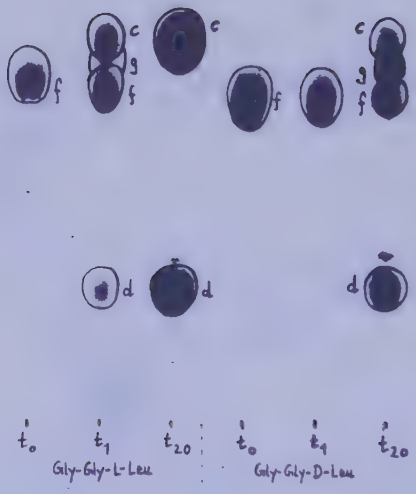


Abb. 7: Papierchromatogramm des Inkubates von Pl-E II mit Gly-gly-L-leu bzw. Gly-Gly-D-leu als Substrate zu den Zeiten t_o, t_1, t_{20}.

c = Leucin

d = Glycin

f = Gly-gly-leu

g = Gly-leu

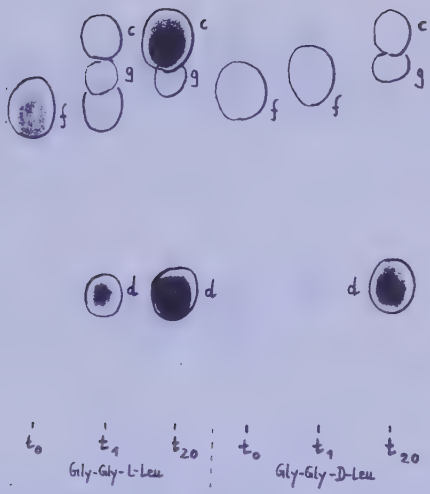


Abb. 8: Papierchromatogramm des Inkubates von EH-E I mit Gly-gly-L-leu bzw. Gly-gly-D-leu als Substrate zu den Zeiten t_o, t_1, t_{20}.

c = Leucin

d = Glycin

f = Gly-gly-leu

g = Gly-leu

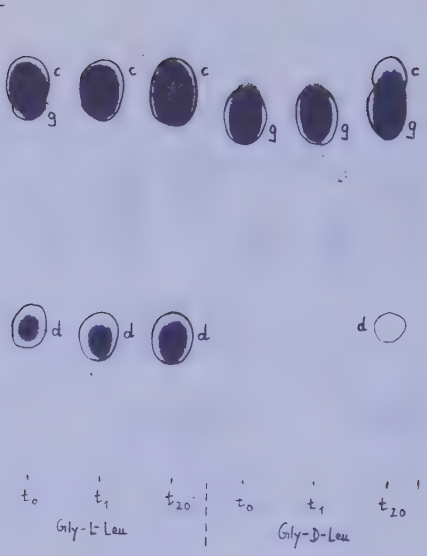


Abb. 9: Papierchromatogramm des Inkubates von Pl-E II mit Gly-L-leu bzw. Gly-D-leu als Substrate zu den Zeiten t_o, t_1, t_{20}.

c = Leucin

d = Glycin

g = Gly-leu

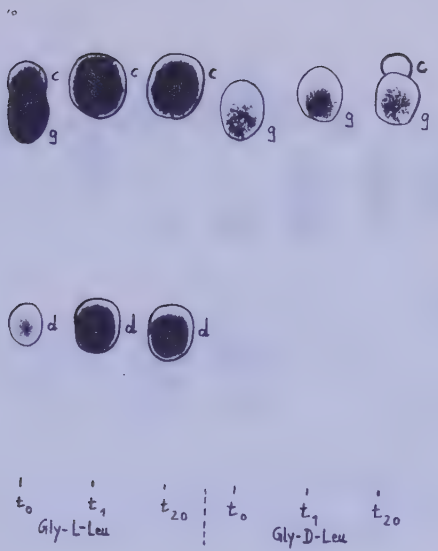


Abb. 1o: Papierchromatogramm des Inkubates von EH-E I mit Gly-L-leu bzw. Gly-D-leu als Substrate zu den Zeiten t_0, t_1, t_{20}.

c = Leucin

d = Glycin

g = Gly-leu

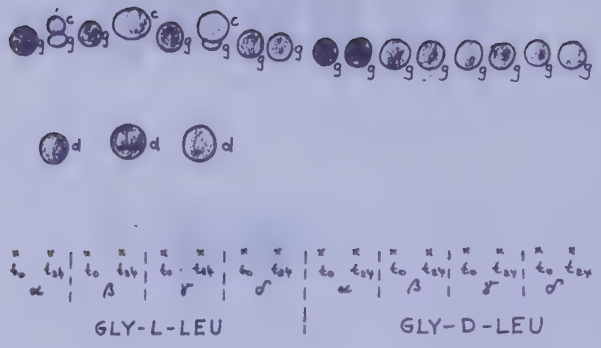


Abb. 11: Dünnschichtchromatogramm der Inkubate der papierelektrophoretischen Fraktionen von Pl-E II (α, β, γ, δ) mit Gly-L-leu bzw. Gly-D-leu als Substrate zu den Zeiten t_o, t_{24}.

c = Leucin

d = Glycin

g = Gly-leu

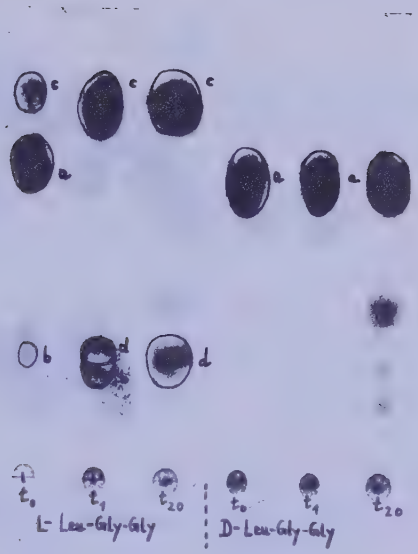


Abb. 12: Papierchromatogramm des Inkubates von Pl-E II mit L-Leu-gly-gly bzw. D-Leu-gly-gly als Substrate zu den Zeiten t_o, t_1, t_{2o}.

a = Leu-gly-gly

b = Gly-gly

c = Leucin

d = Glycin

Abb. 13: Papierchromatogramm des Inkubates von Pl-SI-E II mit L-Leu-gly-gly bzw. D-Leu-gly-gly als Substrate zu den Zeiten t_0, t_1, t_{20}.

a = Leu-gly-gly

b = Gly-gly

c = Leucin

d = Glycin

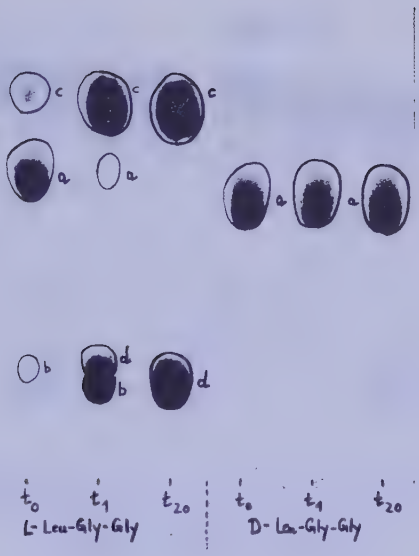


Abb. 14: Papierchromatogramm des Inkubates von EH-E I mit L-Leu-gly-gly bzw. D-Leu-gly-gly als Substrate zu den Zeiten t_0, t_1, t_{20}.

a = Leu-gly-gly

b = Gly-gly

c = Leucin

d = Glycin

Abb. 15: Papierchromatogramm der Inkubate der papierelektrophoretischen Fraktionen von Pl-E II (α, β, γ, δ) mit L-Leu-gly-gly als Substrat zu den Zeiten t_o, t_{12}, t_{24}.

a = L-leu-gly-gly

b = Gly-gly

c = Leucin

d = Glycin

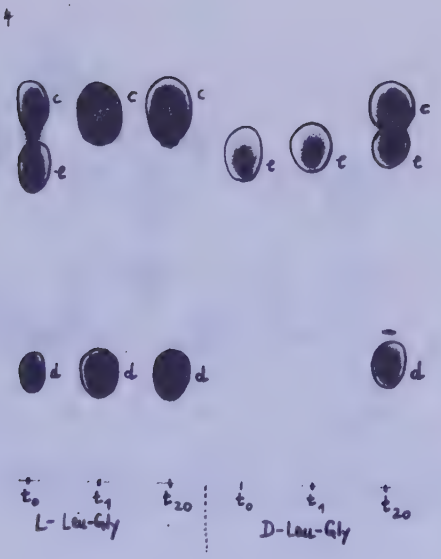


Abb. 17: Papierchromatogramm des Inkubates von Pl-E II mit L-Leu-gly bzw. D-Leu-gly als Substrate zu den Zeiten t_o, t_1, t_{20}.

c = Leucin

d = Glycin

e = Leu-gly

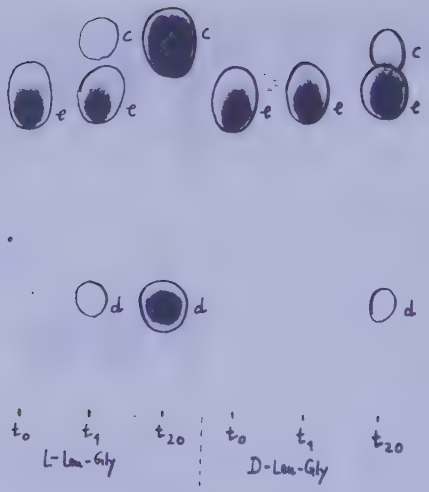


Abb. 18: Papierchromatogramm des Inkubates von EH-SI-E II mit L-Leu-gly bzw. D-Leu-gly als Substrate zu den Zeiten t_o, t_1, t_{20}.

c = Leucin

d = Glycin

e = Leu-gly

Abb. 19: Dünnschichtchromatogramm der Inkubate von Pl-E II mit L-Carnosin bzw. D,L-Carnosin als Substrate zu den Zeiten t_o, t_1, t_{2o}.

a = Carnosin

b = Histidin

c = ß-Alanin

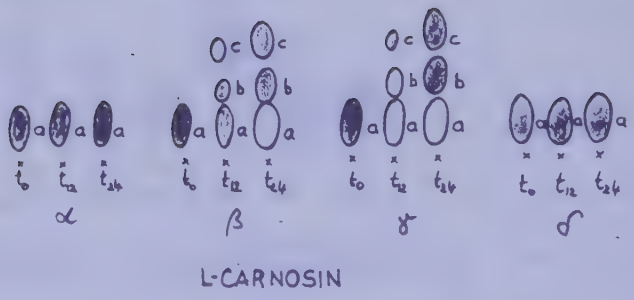


Abb. 2o: Dünnschichtchromatogramm der Inkubate der papierelektrophoretischen Fraktionen von Pl-E II (α, β, γ, δ) mit L-Carnosin als Substrat zu den Zeiten t_0, t_{12}, t_{24}.

a = L-Carnosin

b = Histidin

c = ß-Alanin

An dieser Stelle möchte ich Herrn Priv.-Doz. Dr. E. ZOCH für die Überlassung des Themas und die freundliche Beratung und Unterstützung meinen herzlichen Dank sagen.

LEBENSLAUF

Am 29.11.1941 wurde ich als 2. Kind der Eheleute Paul Müller und Regina Müller geborene Jenner in Dillingen/Saar geboren. Vom 1.9.1947 bis zum 13.7.1951 besuchte ich die katholische Volksschule in Dillingen, anschließend bis zum 1.7.1957 das Staatliche Mädchengymnasium Dillingen bis zur Obersekundareife.

Vom 16.7.1957 bis zum 31.7.1963 war ich im mittleren Beamtendienst bei der Deutschen Bundespost beschäftigt, erst als Postassistentinanwärterin (2 1/2 Jahre), dann - nach Ablegen der Prüfung für den mittleren Postdienst - als Postassistentin.

Vom 15.8.196o bis zum 6.3.1964 besuchte ich das Staatliche Abendgymnasium in Saarbrücken, an dem ich am 6.3.1964 die Reifeprüfung ablegte.

Am 15.4.1964 begann ich das Medizin-Studium an der Universität des Saarlandes, bestand am 5.3.1965 das Vorphysikum, am 2o.1o.1966 das Physikum, im Herbst 1969 das medizinische Staatsexamen.